

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
VERÔNICA CHAGAS MITT

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM
QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

Florianópolis

2016

VERÔNICA CHAGAS MITT

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM
QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito para a conclusão
do Curso de Graduação em Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
Co-orientador: Profa. Dra. Michelle Tillmann Biz

Florianópolis,

2016

Verônica Chagas Mitt

**Avaliação da presença de células tronco mesenquimais em queilite actínica e carcinoma
epidermóide de lábio**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 20 de outubro de 2016.

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Filipe Modolo Siqueira,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa., Dra. Dayane Machado Ribeiro,
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Oscar Bruña Romero,
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar a oportunidade e abrir todas as portas possíveis para que eu realizasse o curso de Odontologia, que há muito tempo era um grande sonho! Agradeço por Ele suprir todas as minhas necessidades e por me dar a inteligência e capacidade para realizar este trabalho, concluindo assim uma das etapas mais importantes da minha vida.

Agradeço à minha família! Pai, mãe e irmãos, que sempre foram os mesmos, apesar do tempo e da distância! Continuam sempre sendo a minha casa, as companhias mais agradáveis e o porto mais seguro! Avó e tia, que me receberam com tanto carinho e cuidado por todo o tempo desse curso! Sem vocês nada disso seria possível!

Agradeço aos meus professores, que fizeram com que assistir às aulas fosse um prazer, e não obrigação.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Filipe Modolo por, em primeiro lugar, me receber como participante da sua pesquisa, por ensinar coisas completamente novas para mim, exigir de mim e confiar na minha capacidade, e por estar sempre acessível em todos os momentos que foi preciso!

Agradeço à mestrandia Fernanda Scotti, pela parceria em todas as etapas do trabalho, desde a elaboração do projeto até a obtenção dos resultados, fazendo com que tudo se tornasse mais tranquilo e agradável de se fazer!

Agradeço ao Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina e aos colegas de laboratório, pela obtenção dos casos para o estudo e de todos os materiais e espaço necessário para as reações.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os meus amigos! Aos antigos de Palmas, que contribuem para que a minha saudade de casa seja ainda maior, e pelos novos amigos de Floripa, que fizeram com que essa cidade se tornasse mais bonita e interessante depois que os conheci!

RESUMO

Os marcadores de superfície Nanog e Oct3/4 são conhecidos, entre tantos outros, como marcadores de células tronco cancerosas (CTCs). Nanog está muito relacionado com a proliferação celular, quimiorresistência e metástase, enquanto Oct3/4 está relacionado com a manutenção da capacidade de pluripotência e auto-renovação celular. Este trabalho teve como objetivo investigar a presença de CTCs em 30 casos de queilite actínica (QA), 30 casos de carcinoma epidermóide de lábio (CEL) e 20 casos de mucocoele (MUC) diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB/UFSC) por meio da análise imuno-histoquímica dos marcadores celulares Nanog e Oct3/4. As reações de imuno-histoquímica foram feitas pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase e foram avaliadas as médias de células com citoplasma e núcleos positivos, além da comparação estatística entre as doenças e entre os anticorpos. Os resultados mostraram maior expressão dos dois marcadores nos casos de QA, e a expressão de Nanog foi maior que a expressão de Oct3/4 em todas as lesões estudadas, sendo significativamente maior em QA e CEL. A expressão destes marcadores verificada neste trabalho pode estar relacionada com a presença de CTCs nos tecidos doentes e pode apresentar um papel importante na evolução de lesões de pré-malignas para malignas.

Palavras-chave: Nanog, Oct3/4, células tronco cancerosas, queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio

ABSTRACT

The surface markers Nanog and Oct3/4 are known as cancer stem cell markers. Nanog is closely related to cell proliferation, metastasis and chemoresistance while Oct3/4 is associated with the maintenance of cell pluripotent capacity and self-renewal. This study aimed to investigate the presence of CTCs in 30 cases of actinic cheilitis, 30 cases of lip squamous cell carcinoma and 20 cases of mucocele diagnosed at the Oral Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Catarina (LPB/UFSC) through immunohistochemical analysis of cell markers Nanog and Oct3/4. The immunohistochemical reactions were made by the streptavidin-biotin-peroxidase method, the average of cells with positive nuclei and cytoplasm were evaluated and statistical comparisons among the diseases and the antibodies were made. The results showed higher expression of both markers in cases of actinic cheilitis, Nanog expression was higher than the expression of Oct3/4 in all studied lesions, and significantly higher in QA and CEL. The expression of these markers observed in this work can be related to the presence of CTCs in the tissues and could show an important role in the progression from premalignant to malignant lesions.

Keywords: Nanog, Oct3/4, cancer stem cells, actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: expressão imuno-histoquímica de Oct3/4 e Nanog em MUC, QA e CEL (400x) (barra de escala 50µm)	26
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de imunomarcção citoplasmática para os anticorpos Nanog e Oct3/4 nas lesões estudadas com o desvio padrão.	25
Tabela 2. Porcentagem de imunomarcção nuclear para os anticorpos Nanog e Oct3/4 nas lesões estudadas com o desvio padrão.	25
Tabela 3. Correlação de imunomarcção citoplasmática de cada lesão entre os dois anticorpos, Nanog e Oct3/4 – valores de media e desvio padrão.	26
Tabela 4. Correlação de imunomarcção nuclear de cada lesão entre os dois anticorpos, Nanog e Oct3/4 – valores de media e desvio padrão.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEB Carcinoma epidermóide bucal

CEBD Carcinomas epidermóides bem diferenciados

CEL Carcinoma epidermóide de lábio

CEMD Carcinomas epidermóides moderadamente diferenciados

CEPD Carcinomas epidermóides pouco diferenciados

CTCs Células tronco cancerosas

CTMs Células tronco mesenquimais

DEI Displasia epitelial intensa

DEL Displasia epitelial leve

DEM Displasia epitelial moderada

CTHs Células tronco hematopoiéticas

INCA Instituto Nacional do Câncer

LPB Laboratório de Patologia Bucal

MUC Mucocele

OMS Organização Mundial da Saúde

OSCC Carcinoma oral de células escamosas

QA Queilite actínica

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

UV Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Queilite Actínica	12
1.2	Carcinoma Epidermóide de Lábio	13
1.3	Mucocele	14
1.4	Células tronco mesenquimais	14
1.5	Células tronco cancerosas	16
1.5.1	Nanog	16
1.5.2	Oct3/4	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Delineamento de estudo	21
3.2	Aspectos éticos e legais	21
3.3	Local da realização do estudo	21
3.4	Amostra	21
3.4.1	<i>Seleção da amostra</i>	21
3.4.2	<i>Critérios de inclusão</i>	21
3.4.3	<i>Critérios de exclusão</i>	22
3.5	Procedimentos laboratoriais	22
3.6	Avaliação da imunorreatividade	23
3.7	Análise dos dados	24
4	RESULTADOS	25
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÕES	31
	REFERÊNCIAS	32
	ANEXO A	37

1 INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 15.490 novos casos de câncer da cavidade oral para o ano de 2016, no Brasil. Segundo o INCA, estes valores correspondem a um risco de 11,27 novos casos a cada 100 mil homens e 4,21 novos casos a cada 100 mil mulheres. Ainda segundo dados do INCA, na Região Sul, o câncer de boca é o sexto tipo de câncer mais frequente em homens, e ocupa a décima quinta posição entre as mulheres (Brasil, 2015). Esses dados mostram a importância em buscar informações sobre o mecanismo de desenvolvimento dessa doença, com o objetivo de encontrar novos meios de prevenção e tratamento para a mesma.

O carcinoma epidermóide de lábio (CEL) é uma neoplasia maligna fortemente relacionada à exposição solar prolongada. Acredita-se ser precedida pela queilite actínica (QA), uma doença labial com presença de alterações celulares provocadas pela exposição crônica e prolongada à radiação ultravioleta.

Estudos têm demonstrado a possibilidade de que o câncer, de uma forma geral, se desenvolva a partir de células tronco presentes nos tecidos, que tenham sofrido mutações e passem a se comportar como células tronco cancerosas (CTCs), dando início à formação do câncer. Outra hipótese é a de que o mesmo tumor se inicie a partir de células diferenciadas, que sofram um processo de “desdiferenciação”, adquirindo a capacidade de pluripotência, característica comum às células tronco. Tais células perderiam o controle tanto na diferenciação quanto na proliferação celular, levando ao desenvolvimento do tumor.

Para compreender o funcionamento das células tumorais, diversos estudos têm sido realizados, dentre eles, a detecção de fatores de transcrição através de ensaios de imuno-histoquímica, com o objetivo de desenvolver o conhecimento sobre as características e comportamentos das células tumorais.

Seguindo esta linha de pesquisa, o presente trabalho visa o estudo da presença de CTCs, através de reações de imuno-histoquímica, utilizando os marcadores celulares Oct3/4 e Nanog, em tecidos de CEL, QA e mucocle (MUC).

1.1 Queilite Actínica

A queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente malignizável, ou seja, que apresenta um risco aumentado de crescimento celular desordenado e de transformar-se em câncer, resultante da exposição crônica e prolongada à radiação ultravioleta (UV) (SILVERMAN *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2012). Acomete, mais frequentemente, o lábio inferior de homens de pele clara com idade entre sexta a sétima décadas de vida, uma vez que os danos causados pela radiação UV são acumulativos (KAUGARS *et al.*, 1999; CAVALCANTE *et al.*, 2008). Esta lesão é semelhante à queratose actínica, doença cutânea potencialmente malignizável também relacionada à exposição crônica e excessiva à radiação UV (NEVILLE *et al.*, 2009). No entanto, a epiderme, por possuir melanina e espessa camada de queratina, proporciona uma proteção natural contra os efeitos nocivos da radiação UV, já o lábio, por ser semimucosa, apresenta camada córnea mais delgada e menor quantidade de melanina quando comparado à pele, o que faz com que seja mais vulnerável aos efeitos nocivos da radiação UV (VIEIRA *et al.*, 2012).

A exposição crônica à radiação UV pode levar a alterações genotípicas e fenotípicas das células epiteliais, genericamente chamadas de atipias ou displasias epiteliais, que podem ser consideradas alterações pré-malignas por estarem associadas a um aumento de 10 a 20% do risco para desenvolvimento do carcinoma epidermóide (DOS SANTOS *et al.*, 2003). Dentre estas alterações, destacam-se as alterações no ciclo celular e nos mecanismos de apoptose (OUHTIT *et al.*, 2000).

O diagnóstico da QA é baseado em achados clínicos e histopatológicos. Clinicamente, a lesão caracteriza-se por atrofia e ressecamento da semimucosa labial, escurecimento ou perda da nitidez da linha mucocutânea, descamação constante e até a formação de ulcerações (NEVILLE e Day, 2002; MARKOPOULOS *et al.*, 2004; CAVALCANTE *et al.*, 2008). Histologicamente, é caracterizada por um epitélio de revestimento atrófico ou acantótico, hiperkeratótico e com graus variados de displasia epitelial. A lâmina própria mostra degeneração basofílica do colágeno induzida pela radiação UV e, comumente, observa-se um infiltrado inflamatório crônico adjacente ao epitélio displásico (MARKOPOULOS *et al.*, 2004; SILVERMAN *et al.*, 2004; NEVILLE *et al.*, 2009).

É essencial que o grau de displasia epitelial seja determinado juntamente com o diagnóstico histopatológico da QA (KAUGARS *et al.*, 1999). Segundo a mais recente

classificação dos tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS), as displasias epiteliais são caracterizadas tanto pelo seu aspecto citológico quanto arquitetural e, quando presentes em um epitélio alterado, podem ser classificadas em displasia leve (DEL), displasia moderada (DEM) e displasia intensa (DEI) (KULCENTY *et al.*, 2015). O tratamento da QA pode ser cirúrgico ou não dependendo, principalmente, do grau de displasia. Os pacientes necessitam de um contínuo monitoramento clínico e de educação em relação à proteção de seus lábios dos danos provenientes da exposição à radiação UV (KAUGARS *et al.*, 1999).

1.2 Carcinoma Epidermóide de Lábio

O Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer, por meio da publicação “Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil”, estima a ocorrência de 15.490 casos novos de câncer bucal em 2016 no Brasil, sendo 11.140 em homens e 4.350 em mulheres (BRASIL, 2015). Segundo dados do INCA, no ano de 2013 foram registrados 5.401 mortes devido ao câncer de boca no Brasil, dentre essas, 4.223 homens e 1.178 mulheres (BRASIL, 2014). O carcinoma epidermóide de lábio (CEL) corresponde a 25-30% desses casos (LUNA-ORTIZ *et al.*, 2004). É uma doença fortemente relacionada à exposição solar crônica e, por isso, apresenta grande relevância no Brasil, um país tropical com elevada incidência de radiação UV e elevada exposição populacional a essa radiação, tanto na área rural quanto urbana, devido principalmente à sua ocupação profissional (PRADO e PASSARELLI, 2009; SENA *et al.*, 2010).

Acredita-se que o CEL seja precedido pela QA e, por isso, o perfil do paciente seja parecido: normalmente homens de pele clara, com idade entre a 7ª e 8ª décadas de vida, sendo o lábio inferior mais acometido (NEVILLE e DAY, 2002; LUNA-ORTIZ *et al.*, 2004; REGEZI *et al.*, 2008). As características clínicas desta enfermidade são variáveis, dependendo do estágio em que a lesão se encontra. As lesões geralmente são assintomáticas e aparecem, inicialmente, sob a forma de uma úlcera crônica que não cicatriza ou como uma lesão exofítica que, ocasionalmente, possui uma natureza verrucosa (ANTUNES e ANTUNES, 2004; SILVA *et al.*, 2006; REGEZI *et al.*, 2008). Caracteriza-se, histologicamente, pela presença de cordões ou ilhas de epitélio neoplásico apresentando pleomorfismo nuclear e celular, hipercromatismo nuclear, aumento no número de mitoses e mitoses atípicas, entre outras

alterações. No estroma observa-se tecido conjuntivo denso exibindo degeneração basofílica do colágeno e infiltrado inflamatório crônico (NEVILLE *et al.*, 2009).

Segundo a classificação histológica da OMS para os carcinomas epidermóides, estes podem ser graduados em bem diferenciados (CEBD), onde as células neoplásicas são muito similares ao epitélio de origem; pouco diferenciados (CEPD), onde o tecido neoplásico apresenta muitas alterações celulares e arquiteturais, tornando difícil identificação do tecido de origem; ou moderadamente diferenciados (CEMD), onde a neoplasia apresenta características entre esses dois extremos (ANNEROTH *et al.*, 1987; DE ARAÚJO *et al.*, 1997; KULCENTY *et al.*, 2015). A cirurgia, acompanhada ou não de radioterapia, continua a ser o padrão ouro de tratamento do CEL. Quando comparado com carcinoma epidermóide intra bucal, o prognóstico para o CEL é bom, com uma taxa de sobrevivência em cinco anos de 95% (NEVILLE e DAY, 2002; GUTIÉRREZ-PASCUAL *et al.*, 2012).

1.3 Mucocele

A mucocele (MUC) é uma lesão benigna geralmente relacionada a trauma que resulta na ruptura de um ducto de glândula salivar e extravasamento de muco para os tecidos moles (LEE *et al.*, 2009; NEVILLE *et al.*, 2009).

A lesão é assintomática e apresenta-se como um aumento de volume recorrente de consistência flutuante, com tamanho variando entre 1 e 2 cm e acomete principalmente o lábio inferior de crianças e adultos jovens, podendo ser relatadas em qualquer idade (NEVILLE *et al.*, 2009; MORE *et al.*, 2014). Microscopicamente, apresenta-se como uma área de mucina extravasada circundada por tecido de granulação. A inflamação apresenta numerosos macrófagos espumosos (NEVILLE *et al.*, 2009).

Muitas destas lesões rompem-se e cicatrizam sozinhas, porém, quando de natureza crônica, necessitam de intervenção cirúrgica para retirada da lesão e da glândula salivar relacionada para que se diminuam os riscos de recorrência (NEVILLE *et al.*, 2009; CARLSON, 2015).

1.4 Células tronco mesenquimais

As células tronco são cada vez mais o foco de diversas áreas da pesquisa biomédica. Estas células são consideradas pluripotentes, com capacidade clonogênica e de auto-

renovação, além da capacidade de se diferenciarem em tipos celulares dos tecidos em que residem e muitas vezes para trans-diferenciarem-se. O potencial de trans-diferenciação de células tronco e sua capacidade de renovação e reparação de danos teciduais trazem-nas para o foco de interesse da biotecnologia e da clínica diária (HOMBACH-KLONISCH *et al.*, 2008).

As mesmas qualidades que tornam as células tronco valiosas na medicina regenerativa, na engenharia tecidual e na biotecnologia também carregam riscos para o organismo do hospedeiro. As mutações que afetam o seu potencial de diferenciação combinado com a falta de controle da sua capacidade proliferativa ilimitada, pode transformá-las em "células tronco cancerosas" (CTCs) (HOMBACH-KLONISCH *et al.*, 2008).

Além das células tronco hematopoiéticas (CTHs), a medula óssea também abriga células tronco mesenquimais (CTMs). Estas células são negativas para os marcadores CD14, CD34 e CD45 (HOMBACH-KLONISCH *et al.*, 2008). As CTMs estão presentes em número reduzido na medula óssea e em diferentes tecidos do organismo (FOX *et al.*, 2007). Apenas 0,001-0,01% das células mononucleares isoladas da medula óssea têm propriedades de CTM, mas a sua multipotência e a sua capacidade proliferativa *in vitro* tornaram-nas atrativas para novas abordagens terapêuticas, com o objetivo de alcançar a recuperação de tecidos danificados ou doentes (PITTENGER *et al.*, 1999).

Shake *et al.* (2002) implantaram CTMs em músculo cardíaco animal pós infarto. Eles verificaram que as células parecem enxertar preferencialmente em regiões de tecido necrótico e aderem à matriz rica de colágeno. Recentemente, estudos clínicos sugeriram que a transferência efetiva de CTM pode levar a benefícios terapêuticos em um número cada vez maior de doenças (FOX *et al.*, 2007). Estas têm sido utilizadas em diversas terapias, incluindo o tratamento de hemofilia, osteogênese imperfeita, lesões de cartilagem e para acelerar a recuperação da hematopoese após quimioterapia/radioterapia, para evitar cicatrizes após infarto do miocárdio e para o tratamento de lesões neurais após acidente vascular cerebral ou trauma (SHAKE *et al.*, 2002; HOMBACH-KLONISCH *et al.*, 2008). Devido a aplicações terapêuticas promissoras dessas células tronco adultas multipotentes, uma série de estudos clínicos envolvendo CTMs está atualmente em curso (HOMBACH-KLONISCH *et al.*, 2008).

1.5 Células tronco cancerosas

Acredita-se que as células tronco cancerosas (CTCs) desempenhem um papel crucial no processo de iniciação da neoplasia, modulação do microambiente neoplásico, apoptose e senescência celular (REYA e CLEVERS, 2005; COSTEA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2012). Diversos estudos atribuem às CTCs papéis fundamentais na progressão e na invasão do câncer, na resistência à quimioterapia, na recorrência após terapia e na ocorrência de metástases à distância (ZHANG *et al.*, 2012; WATANABE *et al.*, 2014). Estudos recentes identificaram CTCs em um grupo heterogêneo de neoplasias, incluindo o câncer bucal, e caracterizaram-nas como um dos fatores responsáveis pela reincidência dessas lesões mesmo depois da realização do tratamento adequado e também pela alta morbidade e mortalidade de pacientes portadores de tais doenças (REYA e CLEVERS, 2005; COSTEA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2012).

CTCs bucais podem surgir a partir de células tronco epiteliais adultas, células progenitoras ou por meio da desdiferenciação de células maduras (SINHA *et al.*, 2013). Segundo Sinha *et al.* (2013), as mutações nos oncogenes presentes em neoplasias malignas bucais podem conduzir ao processo de desdiferenciação seguido por auto-renovação das células em proliferação. Assim, o crescimento e a propagação do câncer bucal seriam impulsionados por CTCs capazes, em longo prazo, de auto-renovação e geração de populações de células tumorais fenotipicamente diversificadas (REYA e CLEVERS, 2005).

Populações de CTCs presentes em cânceres bucais apresentaram regulação positiva para alguns genes relacionados com células tronco, como o *Nanog*, *Oct3/4*, *Nestin*, *CK19*, *BMI-1*, *CD117* (c-kit), *CD44* e *CD133* (ZHANG *et al.*, 2009).

1.5.1 Nanog

O Nanog é uma proteína que exerce papel de fator de transcrição e está expressa em células tronco embrionárias e superexpressa durante o desenvolvimento neoplásico (WATANABE *et al.*, 2014). O Nanog possui um papel significativo na manutenção da diferenciação e na proliferação de células neoplásicas (WATANABE *et al.*, 2014) e tem se mostrado importante em vários tipos de neoplasias, entre elas, o câncer de boca (CHIOU *et al.*, 2008).

Watanabe *et al.* (2014) identificou sobre-expressão de Nanog em carcinoma epidermóide bucal (CEB) pouco diferenciado. Os CEB bem diferenciados estudados eram compostos por células diferenciadas na região central do tumor, e a maioria de células tumorais não diferenciadas, expressando Nanog, se encontrava na periferia do foco tumoral. A imunofluorescência mostrou que as linhagens celulares de carcinoma oral de células escamosas (OSCC) expressaram de forma uniforme a proteína Nanog. Tais resultados indicam que o Nanog é expresso não apenas em CTCs, mas também em grande proporção de células do CEB que são indiferenciadas e com alta taxa de proliferação.

A expressão de Nanog também está positivamente associada à resistência à quimioterapia (IZUMIYA *et al.*, 2012). Estudos sugerem que o aumento da expressão dos marcadores de pluripotencialidade Oct4 e Nanog está associado a propriedades quimiorresistentes de pacientes com CEB (quimiorresistência à cisplatina) (TSAI *et al.*, 2011).

Dados de RT-PCR em tempo real demonstraram que os genes "*stemness*" (*Nanog*, *Oct4*, *Bmi1*, e *Nestin*, especialmente *Nanog* e *Oct4*) foram ativados de forma significativa em células OC2 (células da mucosa bucal de pacientes com câncer) resistentes à cisplatina e, assim como os resultados do RT-PCR em tempo real, as análises de Western blotting também demonstraram elevada expressão de Nanog, Oct4, Bmi1, e Nestin em células OC2 resistentes à cisplatina (TSAI *et al.*, 2011).

No estudo de Watanabe *et al.* (2014) os focos metastáticos de CEB presentes em linfonodos apresentaram expressão imuno-histoquímica extremamente elevada de Nanog, mesmo após a quimioterapia pré-operatória, indicando que as células neoplásicas Nanog-positivas sobreviveram e proliferaram.

A proteína Nanog está associada com proliferação, independente do ciclo celular, tanto em células indiferenciadas do CEB, como em CTCs. Pacientes em que as células do foco primário de CEB não expressavam Nanog passaram a expressar Nanog em focos metastáticos. Como mencionado acima, tumores Nanog-negativos podem conter um número pequeno de células de CEB indiferenciadas, assim como poucas CTCs (WATANABE *et al.*, 2014).

1.5.2 Oct3/4

O Oct3/4 é uma proteína expressa em células tronco embrionárias e germinativas pluripotentes pertencente à família POU, sendo também conhecido por Oct3, Oct4 ou POU5F1 (GOTO *et al.*, 1999; HANSIS *et al.*, 2000; LOOIJENGA *et al.*, 2003; TAI *et al.*, 2005). A sua expressão em células não malignas é restrita às células embrionárias pluripotentes e células germinais (HOMBACH-KLONISCH *et al.*, 2008).

A expressão do gene *Oct3/4* é essencial para a auto-renovação das células tronco embrionárias, sendo negativamente regulada durante a diferenciação celular (LOOIJENGA *et al.*, 2003). A proteína Oct3/4 desempenha um papel central nas células tronco embrionárias indiferenciadas, caracterizadas pela sua atividade de pluripotência e auto-renovação (MATOBA *et al.*, 2006). Sua presença está relacionada com a capacidade de pluripotência das células germinativas neoplásicas e, portanto, esta proteína é um importante marcador imuno-histoquímico para identificar CTCs (LOOIJENGA *et al.*, 2003).

O fator de transcrição Oct3/4 é considerado como um dos melhores indicadores da capacidade de célula-tronco (DE JONG E LOOIJENGA, 2006). A proteína Oct3/4 também é um marcador confiável no diagnóstico de tumor de células germinativas, sendo expresso nas lesões que podem iniciar gonadoblastoma e carcinoma *in situ*, assim como em carcinoma embrionário invasivo e seminomas (HOMBACH-KLONISCH *et al.*, 2008).

Foi verificado que a supressão do Oct3/4 resulta em diminuição da taxa de proliferação de células tronco embrionárias (LEE *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012). Em estudo realizado por Wang *et al.* (2009), pacientes com carcinoma de células escamosas do esôfago moderadamente e fortemente imunomarcados para Oct3/4 tiveram uma sobrevida global mais pobre do que pacientes com marcação fraca ou negativa. As linhagens de células tumorais pouco diferenciadas do carcinoma esofágico expressaram altos níveis de Oct3/4 e SOX2. Portanto, os altos níveis de expressão das proteínas Oct3/4 e SOX2 nos carcinomas esofágicos estão correlacionados com alto grau histológico e pior sobrevida dos pacientes (WANG *et al.*, 2009).

Atualmente, decisões terapêuticas para o tratamento de câncer de boca fundamentam-se em parâmetros clínicos e patológicos, incluindo: idade, metástase, fase e o grau histológico do tumor. Contudo, estes fatores não distinguem de maneira precisa entre um tumor mais ou menos agressivo. Por isso, a identificação do perfil de CTCs presentes

nessas lesões permitiria o estabelecimento de estratégias terapêuticas mais eficientes, contra antígenos específicos. Assim sendo, este estudo visa avaliar a presença e distribuição das CTCs em carcinomas epidermóides de lábio (lesão maligna), em queilites actínicas (lesão potencialmente malignizável) e em mucocelos (lesão não neoplásica) por meio da análise imuno-histoquímica das proteínas Nanog e Oct3/4. É importante destacar que não existe na literatura indexada a análise de tais proteínas nessas doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar a presença das CTCs em 30 casos de QA, 30 casos de CEL e 20 casos de MUC diagnosticados na Universidade Federal de Santa Catarina por meio da análise imuno-histoquímica dos marcadores celulares Nanog e Oct3/4.

2.2 Objetivos Específicos

- Levantar 30 casos de QA, 30 casos de CEL e 20 casos de MUC diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC);
- Classificar as QAs de acordo com seus graus de displasia epitelial;
- Classificar os CELs de acordo com seus graus de diferenciação;
- Avaliar a expressão imuno-histoquímica do marcador celular Nanog, em QAs, CELs e MUC, evidenciando o local e frequência desta expressão;
- Avaliar a expressão imuno-histoquímica do marcador celular Oct3/4, em QAs, CELs e MUC, evidenciando o local e frequência desta expressão;
- Comparar a expressão dos marcadores celulares em estudo entre as QAs, CELs e MUC;
- Testar correlações entre a expressão dos marcadores celulares Nanog e Oct3/4 nas lesões de QA, CEL e MUC;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento de estudo

O estudo proposto é do tipo observacional descritivo, retrospectivo.

3.2 Aspectos éticos e legais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o parecer 1.147.642, CAAE: 45349215.0.0000.0121 (ANEXO A).

3.3 Local da realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.4 Amostra

Para a presente pesquisa, optou-se por uma amostra de conveniência do acervo do Laboratório de Patologia Bucal (LPB/UFSC).

3.4.1 *Seleção da amostra*

A seleção da amostra foi feita a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal (LPB/UFSC). Foram selecionados 30 casos de QA, 30 casos de CEL e 20 casos de MUC de pacientes com idade superior a 18 anos que tiveram estes diagnósticos a partir dos serviços do LPB.

3.4.2 *Crítérios de inclusão*

- Casos de pacientes que tinham idade superior a 18 anos e diagnóstico de queilite actínica, carcinoma epidermóide de lábio e mucocle participam da amostra.

- Para compor a amostra, o caso arquivado estava devidamente armazenado em forma de laudo e lesão emblocada em parafina, além de exibir material suficiente para o desenvolvimento da pesquisa.

3.4.3 Critérios de exclusão

- Casos de pacientes que não tinham idade superior a 18 anos ou não tinham diagnóstico de queilite actínica ou carcinoma epidermóide de lábio ou mucocele foram excluídos.

- Os casos arquivados que não estavam devidamente armazenados em forma de laudo e lesão emblocada em parafina ou que não exibiam material suficiente para o desenvolvimento da pesquisa foram excluídos.

3.5 Procedimentos laboratoriais

As amostras foram submetidas à reação de imuno-histoquímica pelo método da estreptoavidina-biotina-peroxidase, para avaliação dos marcadores celulares Nanog e Oct3/4, utilizando-se anticorpos primários específicos para esses antígenos. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos. O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário. O tecido usado como controle positivo e negativo, em ambos os anticorpos, foi o carcinoma espinocelular intra-oral.

Das amostras previamente fixadas em formol e emblocadas em parafina, foram obtidos cortes teciduais de 3 µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro tratadas com solução de 3-aminopropyltriethoxylene (Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, CA, USA) e levados à estufa a 60°C por 15 minutos.

Em seguida os cortes sofreram desparafinização em xilol e foram reidratados em uma sequência decrescente de etanol constituída por cinco passagens de cinco minutos cada, começando pelo etanol absoluto (I, II e III), seguida pelo etanol 95% e etanol 85%. As lâminas foram posteriormente lavadas em água destilada por dez minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 35% em metanol, durante dois banhos de 20 minutos cada seguindo-se com lavagem em água destilada por 10min.

Para a recuperação dos sítios antigênicos realizou-se o tratamento dos cortes teciduais com tampão citrato 0,01M pH 6,0 em banho-maria a 96°C por 40 minutos. O bloqueio de ligações inespecíficas ocorreu por meio da incubação com leite em pó desnatado (5% em solução tampão Phosphate-buffered saline - PBS), à temperatura ambiente, por 40 minutos, seguida de lavagem com água destilada até a remoção total do leite e duas incubações de cinco minutos cada, com PBS.

A seguir os cortes foram incubados com anticorpos primários Nanog e Oct3/4 (concentração 1:50), a 4°C, overnight. Após o tempo de incubação do anticorpo primário os cortes foram submetidos a lavagens em PBS e então incubados com o anticorpo secundário EnVision FLEX (DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA). A revelação da reação foi feita com o cromógeno diaminobenzidina (DAB+Substrate Chromogen System®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA). Após lavagem com água destilada em dois banhos de 5 minutos cada, os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris, pelo tempo de dois minutos, lavados em água corrente para a remoção do excesso do corante, seguidos de um banho de 30 segundos em hidróxido de amônia e um último banho em água corrente, por 2 minutos. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Alemanha). Os controles positivos foram incluídos em cada reação. Já, como controle negativo, os anticorpos primários foram omitidos da sequência da reação.

3.6 Avaliação da imunorreatividade

Foram capturadas imagens de cinco campos de cada lâmina, em aumento de 400x por meio de microscópio óptico binocular (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital (A620, Cannon, Lake Success, NY, USA), e a um microcomputador (HP Compaq 6005, São Paulo, Brasil), onde estão armazenadas as imagens. A localização dos campos foi padronizada de maneira que os mesmos se localizam de forma equidistante um do outro. Para avaliação foi empregado o software para análise de imagens digitalizadas ImageJ versão 1.41o (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Os núcleos e citoplasmas corados em marrom (células positivas) e em azul (células negativas) foram contados por meio do software e a média dos cinco campos de cada lâmina foi calculada. A avaliação da imunorreatividade foi realizada por um

examinador previamente calibrado e os valores foram registrados em uma planilha previamente elaborada no Microsoft Excel® (Microsoft Office Corporation).

Após a conclusão de toda coleta de dados, foi determinada a proporção das células positivas para cada amostra, expressa em porcentagem. Estes valores foram submetidos a uma análise estatística para comparação entre os grupos.

3.7 Análise dos dados

A comparação da proporção de células positivas foi realizada entre todos os grupos e subgrupos, através de Análise de Variância (ANOVA) - um critério, seguido pelo teste post-hoc de Turkey. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Todos os dados coletados foram organizados em planilha eletrônica e posteriormente analisados no software BioEstat 5.0 (IDSM, Min.Cienc. Tecn., CNPq, Brasil).

4 RESULTADOS

Neste trabalho foram estudadas as expressões imuno-histoquímicas dos anticorpos Nanog e Oct3/4 em 20 casos de Mucocela, 30 casos de Queilite Actínica e 30 casos de Carcinoma Epidermóide de Lábio. As amostras foram obtidas a partir de casos diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB/UFSC). Todos os casos de QA foram classificados de acordo com o grau de displasia, sendo que, dos 30 casos utilizados, 10 (33,33%) casos foram classificados como portadores de displasia leve, 13 (43,33%) displasia moderada e 7 (23,33%) displasia severa. A classificação dos casos de CEL utilizados foi feita de acordo com o grau de diferenciação celular, sendo 9 (30,00%) casos classificados como pouco diferenciados, 10 (33,33%) como moderadamente diferenciados, 10 (33,33%) como bem diferenciados e 1 (3,33%) como carcinoma *in situ*.

Os resultados obtidos são mostrados nas tabelas 1 a 4, que apresentam a média em porcentagem de núcleos e citoplasmas positivos, incluindo o desvio padrão, para todos os casos de MUC, QA e CEL. A análise morfológica revelou marcação de intensidade discreta a moderada dispersa pelos núcleos e citoplasmas de células em todas as camadas (Fig 1)

Enzima		MUC	QA	CEL	*p
Oct3/4	Citoplasma %	3,96%	11,18%	3,68%	p= 0,036
		(±11,02)	(±16,47)*	(±8,52)*	
Nanog	Citoplasma %	14,49%	38,73%	25,56%	p= 0,004
		(±20,89)*	(±31,38)*	(±28,22)	

Tabela 1. Porcentagem de imunomarcção citoplasmática para os anticorpos Nanog e Oct3/4 nas lesões estudadas com o desvio padrão.

Enzima		MUC	QA	CEL	*p
Oct3/4	Núcleo %	0%	0,03%	0%	
		(±0)	(±0,16)	(±0,02)	
Nanog	Núcleo %	10,10%	25,37%	14,67%	p= 0,025
		(±17,35)*	(±26,26)*	(±17,26)	

Tabela 2. Porcentagem de imunomarcção nuclear para os anticorpos Nanog e Oct3/4 nas lesões estudadas com o desvio padrão.

Citoplasma %			
	Oct3/4	Nanog	(p)
MUC	3,96% ($\pm 11,02$)	14,49% ($\pm 20,89$)	0,0569
QA	11,18% ($\pm 16,47$)	38,73% ($\pm 31,38$)	0,0002
CEL	3,68% ($\pm 8,52$)	25,56% ($\pm 28,22$)	0,0003

Tabela 3. Correlação de imunomarcacão citoplasmática de cada lesão entre os dois anticorpos, Nanog e Oct3/4 – valores de media e desvio padrão.

Núcleo %			
	Oct3/4	Nanog	(p)
MUC	0% (± 0)	10,10% ($\pm 17,35$)	0,0154
QA	0,03% ($\pm 0,16$)	25,37% ($\pm 26,26$)	<0,0001
CEL	0% ($\pm 0,02$)	14,67% ($\pm 17,26$)	0,0001

Tabela 4. Correlação de imunomarcacão nuclear de cada lesão entre os dois anticorpos, Nanog e Oct3/4 – valores de media e desvio padrão.

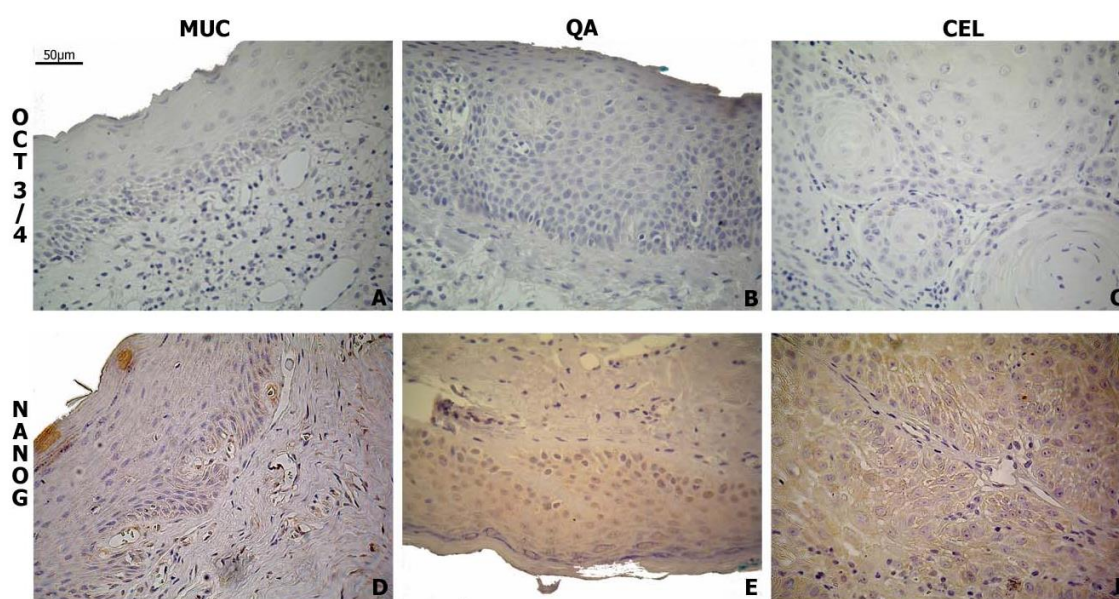


FIGURA 1: expressão imuno-histoquímica de OCT3/4 e NANOG em MUC, QA e CEL (400x) (barra de escala 50µm).

Dentre os resultados obtidos para o anticorpo Oct3/4, observou-se marcação citoplasmática e nuclear pouco frequente nos casos estudados, com destaque para a diferença estatisticamente significante entre QA e CEL na marcação citoplasmática (tabelas 1 e 2). Além disso, observa-se uma tendência de aumento da expressão dessa proteína nos casos de QA.

Já os resultados obtidos para o anticorpo Nanog foram mais expressivos, com destaque para a diferença estatisticamente significativa entre MUC e QA na marcação citoplasmática e nuclear (tabelas 1 e 2). Além disso, novamente, observa-se uma tendência de aumento da expressão dessa proteína nos casos de QA quando comparado aos outros grupos.

Na comparação entre a expressão das duas proteínas nas diferentes lesões observou-se que o Nanog apresentou maior marcação em todos os casos quando comparado com o Oct3/4, destacando-se os casos QA e CEL que apresentaram diferença estatisticamente significativa (Tabelas 3 e 4).

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através da pesquisa mostraram pouca marcação citoplasmática e nuclear para o anticorpo Oct3/4, tanto para lesões não neoplásicas como neoplásicas. Entretanto, estudos realizados por outros autores apresentam resultados diferentes. No estudo de Shimada *et al.* (2012), 30,4% dos casos de carcinoma de células escamosas do esôfago apresentaram marcação positiva para o anticorpo Oct3/4. Matsuoka *et al.* (2012) obteve o resultado de 44% de marcação nuclear positiva para a expressão de Oct3/4 em câncer gástrico. Na pesquisa de El Deeb e Abdelzaher (2014), a expressão de Oct3/4 foi heterogênea, tanto em relação à distribuição quanto à intensidade. Foi encontrada forte expressão dessa proteína em 36,47% dos casos de carcinoma de células escamosas da laringe, e 12,90% de expressão leve da proteína em tecido não neoplásico de laringe.

Diversos autores apresentam resultados com predomínio de expressão de Oct3/4 no núcleo celular. Chiou *et al.* (2008) apresentou esse tipo de marcação em CEB, Palma *et al.* (2013) em gonadoblastoma e tecido gonadal indiferenciado, Matsuoka *et al.* (2012) em câncer gástrico e Wang *et al.* (2009) em carcinoma de células escamosas de esôfago. Outros estudos apresentaram marcação nuclear e citoplasmática, em um mesmo grau de expressão, como nos casos de células pluripotentes induzidas (SHIMADA *et al.*, 2012) e em células tumorais de carcinoma mucoepidermóide (DESTRO RODRIGUES *et al.*, 2016). Diferentemente dos resultados dos outros trabalhos descritos anteriormente, esta pesquisa obteve resultados de marcação predominantemente citoplasmática, com marcação nuclear quase insignificante. Guo *et al.* (2012) relataram que o gene Oct4 codifica três diferentes proteínas de Oct4, sendo elas Oct4A, Oct4B e Oct4B1. O Oct4A é fortemente expresso no núcleo de células tronco e células tronco embrionárias, mantendo a capacidade de pluripotência e auto-renovação das mesmas. Oct4B é expresso predominantemente no citoplasma celular, sendo expresso em células somáticas, não-pluripotentes. Já o Oct4B1 é uma descoberta recente, com expressão tanto em células pluripotentes como em células não-pluripotentes. Este estudo ajudaria a explicar a predominância de marcação citoplasmática na amostra estudada neste projeto.

Como descrito anteriormente, foram encontrados resultados de marcação mais expressiva de Oct3/4 nos casos de QA, lesão pré-maligna, em comparação com a lesão maligna e a lesão não neoplásica. A literatura não fornece muitos estudos que relacionem

lesões pré-malignas com o anticorpo Oct3/4, entretanto, o trabalho de Mccann-Crosby *et al.*, mostra forte relação entre expressão de Oct3/4 em tecido gonadal não neoplásico e o desenvolvimento de neoplasia de células germinais. Mccann-Crosby *et al.* (2015) estudaram vários casos de disgenesia gonadal e relatou expressão mais acentuada de Oct3/4 em gonadoblastoma. O mesmo estudo sugere que a expressão de Oct3/4 em células germinais indiferenciadas, localizadas ao longo da lâmina basal, resulta em alto risco para o desenvolvimento de neoplasia de células germinais, com indicação de gonadectomia como tratamento.

Nosso estudo mostrou uma diferença significativa para a expressão citoplasmática e nuclear de Nanog entre as lesões de MUC e QA, com expressão maior em QA. Outros estudos apresentam resultados semelhantes, com maior expressão da proteína em tecidos displásicos do que em tecidos normais. Zhang *et al.* (2010) em seu estudo, avaliou o papel do Nanog no câncer gástrico. Os resultados mostraram forte expressão de Nanog (66,7%) em tecidos displásicos, enquanto não houve expressão dessa proteína em tecidos normais adjacentes. Ye *et al.* (2008) estudaram a expressão de Nanog em tecidos normais, tecidos com algum grau de displasia (leve, moderada e severa) e tecidos com carcinoma escamoso cervical, obtendo resultados que também mostraram maior expressão de Nanog em tecidos displásicos do que em tecidos normais. Entre um total de 108 casos com algum tipo de displasia (leve, moderada e severa), 102 (94,4%) casos apresentaram marcação positiva para o anticorpo Nanog. Já em tecidos normais, num total de 49 casos, 32 (65,3%) apresentaram marcação positiva para o anticorpo (YE *et al.*, 2008).

Os mesmos estudos citados anteriormente também apresentaram resultados de associação entre Nanog e lesões malignas e displásicas. E um deles, foi mostrado que existe uma associação entre os níveis de expressão de Nanog e a gravidade das alterações de células epiteliais, com níveis de expressão mais elevados em células malignas de câncer cervical e células com algum grau de displasia (YE *et al.*, 2008). Amaya e Bryan (2015) apresentaram, em seu estudo, 50% de expressão de Nanog em tecidos normais, 98% em tumores benignos (hemangioma infantil, hemangioma capilar, hemangioma cavernoso, hemangioma granulomatoso e hemangioma venoso), e 100% em casos de malignidade (angiossarcomas e hemangiopericitomas). Os autores afirmam que o aumento significativo da expressão de Nanog e outros marcadores de superfície de células tronco em tumores

benignos e malignos em relação a tecidos normais, suporta a ideia de que a sobre-expressão destas proteínas poderia influenciar nas propriedades tumorigênicas globais (AMAYA e BRYAN, 2015).

Em um estudo em ratos, analisando a expressão de Nanog durante a transformação maligna quimioinduzida de papilomas da pele, verificou-se que a sobre-expressão de Nanog aumentou consideravelmente a taxa de conversão maligna de papilomas em carcinomas de células escamosas de pele (PALLA *et al.*, 2015). Embora nossos resultados tenham apresentado maior expressão de Nanog em lesão pré-maligna do que em carcinoma epidermóide, a diferença não estatisticamente significativa, e esses dados revelam a importância do papel da expressão deste marcador durante o processo de malignidade.

A comparação entre os resultados de marcação dos dois anticorpos mostrou maior expressão de Nanog em todas as lesões estudadas, sendo que para QA e CEL, os resultados foram estatisticamente significantes. Em estudo realizado com amostras de osteossarcoma, os resultados se apresentaram semelhantes a este trabalho. A expressão de Oct3/4 variou entre uma pequena porcentagem de células em alguns casos e até 25% em outros. A expressão de Nanog também apresentou resultados variados, estando os valores entre 1% a 50% de marcação positiva para o anticorpo (GIBBS *et al.*, 2005). Em outro estudo, numa amostra de 60 casos de câncer de boca, 46,67% dos casos mostrou marcação positiva para Oct3/4, e 48,33% marcação positiva para Nanog. Apesar de o valor ser maior para a expressão de Nanog, a comparação não foi estatisticamente significativa (RAVINDRAN *et al.*, 2014). Diferentemente dos nossos resultados, Matsuoka *et al.* (2012) estudaram 290 amostras de câncer gástrico e 129 casos mostraram expressão de Oct3/4 enquanto apenas 28 mostraram expressão de Nanog. Apesar de não haver na literatura um consenso quanto à relação entre a expressão dos marcadores Nanog e Oct3/4, os dados da pesquisa apresentaram resultados consistentes, que servirão de guia para novos estudos envolvendo estes marcadores nas lesões bucais apresentadas.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho apresentou maior expressão de Nanog nas lesões estudadas quando comparados aos resultados de Oct3/4. A expressão dos dois marcadores também foi maior nas lesões de CEL e QA, mas especialmente maior nas QA. A expressão de Nanog e Oct3/4 está descrita na literatura como marcadores de superfície em células tronco, envolvidas no processo de carcinogênese. Estes dados comprovam a importância da expressão destes marcadores em lesões pré-malignas, entretanto, não deixam claro a razão de haver menor expressão nos casos de malignidade já instalada. Ainda é necessário maior compreensão sobre o assunto, para que os dados de pesquisas cheguem a resultados práticos que expandam os conhecimentos sobre a prevenção e tratamento das neoplasias.

REFERÊNCIAS

- AMAYA, C. N.; BRYAN, B. A. **Enrichment of the embryonic stem cell reprogramming factors Oct4, Nanog, Myc, and Sox2 in benign and malignant vascular tumors.** BMC Clin Pathol, v. 15, p. 18, 2015.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. **Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas.** Scand J Dent Res, v. 95, n. 3, p. 229-49, Jun 1987.
- ANTUNES, A. A.; ANTUNES, A. P. **Lips' tumours retrospective study and literature review: a twenty-eight-year experience.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 50, n. 4, p. 295-300, 2004.
- BRASIL, M. D. S. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil.** INCA, 2014.
- BRASIL, M. D. S. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2015
- CARLSON, E. R. **Diagnosis and management of salivary lesions of the neck.** Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am, v. 23, n. 1, p. 49-61, Mar 2015.
- CAVALCANTE, A. S.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. **Actinic cheilitis: clinical and histological features.** J Oral Maxillofac Surg, v. 66, n. 3, p. 498-503, Mar 2008.
- CHEN, T.; DU, J.; LU, G. **Cell growth arrest and apoptosis induced by Oct4 or Nanog knockdown in mouse embryonic stem cells: a possible role of Trp53.** Mol Biol Rep, v. 39, n. 2, p. 1855-61, Feb 2012.
- CHIOU, S. H. et al. **Positive correlations of Oct4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma.** Clin Cancer Res, v. 14, n. 13, p. 4085-95, Jul 2008.
- COSTEA, D. E. et al. **Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma.** Oral Dis, v. 12, n. 5, p. 443-54, Sep 2006.
- DE ARAÚJO, V. C. et al. **p53 In biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system.** Oral Oncol, v. 33, n. 1, p. 5-9, Jan 1997.
- DE JONG, J.; LOOIJENGA, L. H. **Stem cell marker Oct3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: history and future.** Crit Rev Oncog, v. 12, n. 3-4, p. 171-203, Dec 2006.
- DESTRO RODRIGUES, M. F. et al. **Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma.** J Oral Pathol Med, May 2016.

- DOS SANTOS, J. N. et al. **Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis.** J Cutan Pathol, v. 30, n. 4, p. 237-41, Apr 2003.
- EL DEEB, N. M.; ABDELZAHER, E. **Stem cell markers Oct4 and nestin in laryngeal squamous cell carcinoma and their relation to survivin expression.** Pathol Res Pract, v. 210, n. 11, p. 751-8, Nov 2014.
- FOX, J. M. et al. **Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking.** Br J Haematol, v. 137, n. 6, p. 491-502, Jun 2007.
- GIBBS, C. P. et al. **Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis.** Neoplasia, v. 7, n. 11, p. 967-76, Nov 2005.
- GOTO, T. et al. **Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis.** Mol Hum Reprod, v. 5, n. 9, p. 851-60, Sep 1999.
- GUO, C. L. et al. **A novel variant of Oct3/4 gene in mouse embryonic stem cells.** Stem Cell Res, v. 9, n. 2, p. 69-76, Sep 2012.
- GUTIÉRREZ-PASCUAL, M. et al. **Squamous cell carcinoma of the lip. A retrospective study of 146 patients.** J Eur Acad Dermatol Venereol, v. 26, n. 9, p. 1116-21, Sep 2012.
- HANSIS, C.; GRIFO, J. A.; KREY, L. C. **Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts.** Mol Hum Reprod, v. 6, n. 11, p. 999-1004, Nov 2000.
- HOMBACH-KLONISCH, S. et al. **Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples.** Arch Immunol Ther Exp (Warsz), v. 56, n. 3, p. 165-80, 2008 May-Jun 2008.
- IZUMIYA, M. et al. **Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells.** Anticancer Res, v. 32, n. 9, p. 3847-53, Sep 2012.
- KAUGARS, G. E. et al. **Actinic cheilitis: a review of 152 cases.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v. 88, n. 2, p. 181-6, Aug 1999.
- KULCENTY, K. et al. **Molecular mechanisms of induced pluripotency.** Contemp Oncol (Pozn), v. 19, n. 1A, p. A22-9, 2015.
- LEE, E.; CHO, S. H.; PARK, C. J. **Clinical and immunohistochemical characteristics of mucocoeles.** Ann Dermatol, v. 21, n. 4, p. 345-51, Nov 2009.
- LEE, J. et al. **Oct4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells.** Biochem J, v. 426, n. 2, p. 171-81, Mar 2010.

LOOIJENGA, L. H. et al. **POU5F1 (Oct3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors.** Cancer Res, v. 63, n. 9, p. 2244-50, May 2003.

LUNA-ORTIZ, K. et al. **Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study.** Oral Oncol, v. 40, n. 10, p. 992-9, Nov 2004.

MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. **Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases.** Oral Diseases, v. 10, n. 4, p. 212-216, 2004.

MATOBBA, R. et al. **Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling.** PLoS One, v. 1, p. e26, 2006.

MATSUOKA, J. et al. **Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma.** J Surg Res, v. 174, n. 1, p. 130-5, May 2012.

MCCANN-CROSBY, B. et al. **Association of immunohistochemical markers with premalignancy in Gonadal Dysgenesis.** Int J Pediatr Endocrinol, v. 2015, n. 1, p. 14, 2015.

MORE, C. B. et al. **Oral mucocele: A clinical and histopathological study.** J Oral Maxillofac Pathol, v. 18, n. Suppl 1, p. S72-7, Sep 2014.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial.** 3-. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. **Oral cancer and precancerous lesions.** CA Cancer J Clin, v. 52, n. 4, p. 195-215, Jul-Aug 2002.

OUHTIT, A. et al. **Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin.** Am J Pathol, v. 156, n. 1, p. 201-7, Jan 2000.

PALLA, A. R. et al. **The pluripotency factor Nanog promotes the formation of squamous cell carcinomas.** Sci Rep, v. 5, p. 10205, 2015.

PALMA, I. et al. **Utility of Oct3/4, TSPY and β -catenin as biological markers for gonadoblastoma formation and malignant germ cell tumor development in dysgenetic gonads.** Dis Markers, v. 34, n. 6, p. 419-24, 2013.

PITTENGER, M. F. et al. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** Science, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 1999.

PRADO, B. N.; PASSARELLI, D. H. C. **Uma nova visão sobre prevenção do câncer bucal no consultório odontológico.** Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo, v. 21, n. 1, p. 79-85, 2009.

RAVINDRAN, G. et al. **Association of differential β -catenin expression with Oct4 and Nanog in oral squamous cell carcinoma and their correlation with clinicopathological factors and prognosis.** Head Neck, Apr 2014.

REGÉZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia Oral: Correlações clínico-patológicas**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 420.

REYA, T.; CLEVERS, H. **Wnt signalling in stem cells and cancer**. Nature, v. 434, n. 7035, p. 843-50, Apr 2005.

SENA, M. F. et al. **Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática**. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 56, n. 1, p. 93-102, 2010.

SHAKE, J. G. et al. **Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects**. Ann Thorac Surg, v. 73, n. 6, p. 1919-25; discussion 1926, Jun 2002.

SHIMADA, Y. et al. **Expression analysis of iPS cell - inductive genes in esophageal squamous cell carcinoma by tissue microarray**. Anticancer Res, v. 32, n. 12, p. 5507-14, Dec 2012.

SILVA, F. D. et al. **Prevalence of Lips Pathologies in Fishermen Of Santa Catarina Island**. Revista Odonto Ciência, v. 21, n. 51, p. 37 - 42, 2006.

SILVERMAN, S.; EVERSOLE, L. R.; TRUELOVE, E. L. **Fundamentos de Medicina Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 384.

SINHA, N. et al. **Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer**. Oral Oncol, v. 49, n. 9, p. 854-62, Sep 2013.

TAI, M. H. et al. **Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis**. Carcinogenesis, v. 26, n. 2, p. 495-502, Feb 2005.

TSAI, L. L. et al. **Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma**. J Oral Pathol Med, v. 40, n. 8, p. 621-8, Sep 2011.

VIEIRA, R. A. et al. **Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects**. An Bras Dermatol, v. 87, n. 1, p. 105-14, 2012 Jan-Feb 2012.

WANG, Q. et al. **Oct3/4 and Sox2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma**. Anticancer Res, v. 29, n. 4, p. 1233-41, Apr 2009.

WATANABE, M. et al. **Nanog expression correlates with differentiation, metastasis and resistance to preoperative adjuvant therapy in oral squamous cell carcinoma**. Oncol Lett, v. 7, n. 1, p. 35-40, Jan 2014.

YE, F. et al. **Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells**. BMC Cancer, v. 8, p. 108, 2008.

ZHANG, J. et al. **The human pluripotency gene Nanog/NanogP8 is expressed in gastric cancer and associated with tumor development.** Oncol Lett, v. 1, n. 3, p. 457-463, May 2010.

ZHANG, P. et al. **Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes.** Cancer Lett, v. 277, n. 2, p. 227-34, May 2009.

ZHANG, Z.; FILHO, M. S.; NÖR, J. E. **The biology of head and neck cancer stem cells.** Oral Oncol, v. 48, n. 1, p. 1-9, Jan 2012.

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da presença de células-tronco mesenquimais em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio.

Pesquisador: Filipe Modolo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 45349215.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.556.931

Apresentação do Projeto:

Emenda apresentada ao estudo "Avaliação da presença de células-tronco mesenquimais em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio."

O projeto já foi apreciado e aprovado.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto já foi apreciado e aprovado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto já foi apreciado e aprovado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

ESTA EMENDA ESTÁ SENDO SUBMETIDA AO CEP SH DA UFSC DEVIDO À NECESSIDADE DA INCLUSÃO NO PROJETO DO ESTUDO DA PROTEÍNA BETA-TUBULINA NAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PRESENTES NO CÂNCER. ALÉM DISSO, O EMBASAMENTO TEÓRICO DO PROJETO FOI MELHORADO.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A emenda apresentada foi apresentada com todos os requerimentos atendidos pelo sistema CEP-CONEP.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 1.556.931

Recomendações:

Nenhuma recomendação é necessária.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos de parecer pela aprovação da presente emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_709387_E1.pdf	03/05/2016 09:43:50		Aceito
Outros	parecer_biobanco.pdf	03/05/2016 09:37:36	Filipe Modolo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido_adendo.pdf	03/05/2016 09:36:20	Filipe Modolo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	AVALIACAO_DA_PRESENCA_DE_CELULAS_TRONCO_MESENQUIMAIS_EM_QUEILITE_ACTINICA_E_CARINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO adendo.	03/05/2016 09:35:48	Filipe Modolo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_instituicao_adendo.pdf	03/05/2016 09:34:10	Filipe Modolo	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_emenda_assinada.pdf	03/05/2016 09:30:03	Filipe Modolo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 23 de Maio de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br